

(19)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number **0 126068**

(43) Date of publication of application **27.04.92**

(51) Int. Cl. **C12M 3/00**
C12M 3/06
C12N 5/06
C12N 5/08

(21) Application number **02248858**

(71) Applicant **HITACHI PLANT ENG. CONSTR.
CO. LTD. TOTO LTD.**

(22) Date of filing **17.09.90**

(72) Inventor **KON, MASAHIRO
FUKUSHIMA, YUKIO
SU, UKI, SHIGEMI
YAMANO, SHIGERU
MAEHASHI, NOBUYUKI**

**(54) METHOD FOR CULTURING CELL AND
APPARATUS THEREFOR**

(57) Abst. of

into the container 12, supply the nutrients and oxygen to the cells and the culture solution containing waste products is simultaneously taken out through the perforated plates 20 and the through hole 16.

PURPOSE To culture a large amount of cells at a high density by feeding a fresh culture solution through a through hole formed in a supporting shaft into a hermetically closed container, supplying nutrients and oxygen to cells stuck to perforated plates of a stir unit communicating with the through hole, and simultaneously removing waste products.

COPYRIGHT (C)1992 JPO Japan

CONSTITUTION Steam is fed from a boiler 40 through an inflow port 22 into a hermetically closed container 12 to carry out empty sterilization. Warm water is then circulated from warm water feed port 52 to a jacket 25 of the container 12 to keep the container 12 at a prescribed temperature. A compressor 30 and a vacuum pump 32 are then operated to feed cells from a seed cell vessel 34 into the container 12 and a culture solution is simultaneously fed from a storage tank 39 into the container 12. A buffer solution is subsequently fed from a storage tank 38 through the inflow port 22 into the container 12. The culture solution is then taken out through perforated plates 20 and a through hole 16 in a rotating shaft 14 to stick the cells to the surfaces of the perforated plates 20. A fresh culture solution containing nutrients and oxygen is subsequently fed

本 国 予 計 ⑩

寺 午 A 6 6

11 号 4年(1992)4月27
C 12 3/00 9050-4B
3/06 9050-4B
7236-4B C 12 5/00 E

② 願 平2 24663
② 願 平2(1980)9月17日

②と日者 昆

東 千代 田1丁 1番14号 日 ラン 建設

日 ラン 京 代 田1丁 1番14号

② 人 長 式会 州市 倉北区 島2丁目1番1号

- 1 発注の名称 ①又②(記)の部品の培養装置
- 2 特許請求の範囲 (1)貫通孔を有する文に細胞を付着させる媒体
培養孔の貫通に連通する(1)並
供給すると共に、培養孔内の貫通孔を大気又は減
圧状態を形成すると、(1)細胞培養体の交換
孔を介して取出すことを特徴とする細胞の培養
装置
(2)細胞培養体の交換の貫孔に、細胞多孔板を
細胞を培養させるため、媒体を圧状態で供給
する手段を有し、ことを特徴とする請求項(1)の
培養装置
(3)培養装置内に細胞培養液を供給して、板
の半分又は全半を細胞培養液に浸漬し、後
細胞培養液を、細胞培養液を多孔板で隔
して多孔板を培養を、培養液の交換に供し、こ
の多孔板の上端部の外周に、孔を有する

特許す請求項(1)に、数の細胞の培養方法

(1)新鮮な培養液又は新鮮液を加圧して各培養器

請求項(4) (5)又は(6) 数の細胞の培養方法

することを特許とする請求項 (4) (5)又は(6)記
載の細胞の培養方法

3. 発明の詳細な説明

本発明は培養性の細胞を高密度で大量に培養

産物を取り出す製造設備を備えた細胞の培養

し、
で培
養けること、
と
が固

前に
に

かに

に浸漬するものとあるので、

の
に

養中に培養の供給をすることにより、培養液

抽出

一方、

で、

る。このため、

通過

密度培養技術の適用は生産の効率向上と生産コ
低減のため必要である

と、
に培養する方法として、

と

に細胞

に適用する。

この方法は、

に適用する。

を

た容器内で細胞を膜に付着させて培養する

ので、膜を介して栄養分と

を新鮮な培養

液を細胞に供給

部分的には、

の

高濃度で細胞を培養する

例え

特開昭63-16311号公報参照) このコロフ

バーは、培養液の供給及び取り出しを

利便して行っている。

が解決しようとする課題

養の供給が不十分になるため、部分的にし

高濃度の培養を行えないという問題がある。ま

又

状の

が困難なため、細胞の収容密度が高くなると共にコロ

フバーの再利用が不十分になり、

が問題になるという問題がある。

本発明はこのよう事情に鑑みて成されたもの

に培養や栄養を

に供給して、大

の細胞を高密度に培養できる細胞の培養方法及びそ

本発明は、前記の通りであるに、

に

板(所定部)で

と

と

と

と

と

と

1 図は本発明の 1 実施例

板を、支軸 3 の貫通孔に通過するよ に貫通して
る通過体を、密 容器 1 に 置した培養液を
用い、培養液を 状態にして密閉 器に供給す
支軸 3 の貫通孔を大気圧又は減 状態
にし、液 を含む培養液を多孔板及び貫通孔を介
して取り出すことを特徴としている。

【作用】

本発明によれば、貫通孔が形成され る支軸
に、貫通 に通過するよ に通過体 板を置

使 で、この供給手段を操作 すると新鮮な培養液
を密閉 容器 1 に供給して通過体の多孔板に付着し
細胞に栄養分と 素とを供給し細胞に

【実施例】

下図 1 図面に従 本発明に係る細胞の培養

図 3 図は多孔板 2 の詳細と、その回転軸 14
の取付、状態とを示したもので多孔板 2 は
板の内板で、その内周面 16 を軸 14 の
6 と通過する通孔 18 に 嵌して設
ね いる。多孔板 2 は半径 10 mm、100
mm と用く通孔径が小さ 半径の 持体 26
A 上に孔 18、19、20、21 と かく通孔径
大 多孔板の厚 26 を 多孔板の
多 厚 26 で形 されて る のため、
通過するときには多孔板 2 の表面 の圧力が低
て 多孔板 2 上の ずれの箇所にお
て 貫通孔 18 19 20 21 ずれのとき
ずしくなる。使 て、貫通孔 18 に 箇所だ
らば ことがよく、ずれの
箇所か 均一に培養液の供給及び
とともので、多孔板 2 は 培養液の供給
用及び 細胞の老 死用の 用にと
る 用、多孔板 2 は細胞の付着を容易
めに、表面の粗さを約 20 μ m に調整し
ている。の多孔板 2 は の直径が 300 mm

す全体 である。培養液 0 円筒型の密閉 容
器 12 を備、密閉容器 12 には多 板ユー
13 と、この多 板ユー 13
の回転軸 14 は、第 2 図に示すように密閉容器 12 の
に回転自在 軸 14 には
軸端上に貫通孔 16 が形 されて る。貫通
孔は第 2 図上で、軸 14 の左端部に開口して流
入口 18 A を形成し、但、軸 14 には
ア 状の多孔板 20、21 が装着 ね、この多
孔板 20 は通孔 18 を、して貫通孔 18 に通過
し、いる。

また、密閉容器 12 には、入口 22 と流出口 24
を、密閉容器 12 は内径 330 mm、長さ 100 mm、れ、その中
に多孔板 20、21 が設けられて るので、密閉
容器 12 の有効容積は 42 l である。密閉
容器 12 の外周面には温度調節のために外周管 25
が設け されている。

厚さが 5 mm に形 され、密閉容器 12 の、軸 14
に 8 間隔で 50 枚設 されている。

多孔板 13 が設け されている密閉容器
12 は、1 図に示すように培養液とを、供給する
管 14、36、38、39、40、42、44、46)、及び送液のための圧力源となる、ポン
プ 48、真空ポンプ 32 等に接続されてい
る。

下図 1 図に描いてこれ の状態を説明する
密閉容器 12 の流入口 22 には、循環ポンプ 34、
流液などに使用される培養液のポンプ 35、多孔板
20 を流液するア、り後のポンプ 36、及、培養
液、ポンプ 32、通過されてい、これ のポンプ 34、
36、38 及びア、り後は、ポンプ 38 と接
続されており、ポンプ 38 からの高圧液
で液を加圧し、密閉容器 12 に流れるよ
に、っている。また、流入口 22 には温度調節の装置
を発生す、ポンプ 40 も通過されて る。

図 1 24 には、密閉容器 12 の液を排出する
管 33 A、及び培養液を多孔板 20、供給す

れた。9を細胞培養槽34に送る。6の管33

多孔板20-1の底面側14の底出入口16Aには、培養完了後多孔板20-1の細胞を剥離させるためのブリンを流すために、ブリン貯42が連通されている。このブリン貯42もコンプレッサ30と接続されており、コンプレッサ30からの無菌圧縮空気で液を充填

た。この液出入口16Aに、細胞の生産物を回収する生産物回収44、細胞の老死を回収する老死物回収46が連通されている。貯槽44、46は真空ポンプ32と接続されており

きるようになってる。

培養1期上で48は細胞フィルタ50、培養液供給用及び細胞の生産物取り出し用の切換弁第2期上52は、シャット25への排水供給口54はシャット25からの排水排出口56は、セパ58、60はアブ59、61はベア

器12内に送り、多孔板20-20-1を介して培養液を回収。14の真通孔16から取り出すことによって行う。

これにより、細胞は液とともに多孔板20-20-1に流されるが、多孔板20-20-1を通過することができないので、強制的に多孔板20-20-1の表面に付着させられる。通常1めれている液液のみによる細胞の付着時間が4-14日間を要するのに対し、本発明の方法では約30分で付着が完了する。このため、細胞の付着率及び生存率をほぼ100%にできる。

細胞の生産物を、培養液を取り出して多孔板20-20-1に付着した細胞を大に回収させる。この場合は、密閉容器12の液入口22に、0.1-1.0g/lに圧し、新鮮培養液を圧入し、真通孔16を大気圧または0.05atm程度の減圧状態にし、液出入口16を通じて培養液を取り

る。

次に、発育の細胞の培養装置による培養の例として、人胎胎芽細胞による1-FN（1-FN）の生産を示す。

まず、密閉容器12の液入口22から121で液、培養液を流す。22から121で液、22を20分間、121でに保つことにより、細胞を培養する。次に、液は排水供給口52から排水を流して密閉容器12のシャット25に排水を流通させて密閉容器12を37でに保つ。

この状態、細胞を多孔板20-20-1の表面に付着させる。表面への付着は、コンプレッサ30及び真空ポンプ32を動かして細胞を細胞培養34から密閉容器12内に満たすと共に、液液10-10に移動し、培養液（1-FN液）また、5相液）を培養液（1-FN液）から密閉容器12内に満たした液、細胞と混合液を流通させ、（P-S液）を、5g/lに圧入して、細胞培養槽34から液入口22を介して密閉容

器12内に送り、多孔板20-20-1を介して培養液を回収。14の真通孔16から取り出すことによって行う。

これにより、細胞は液とともに多孔板20-20-1に流されるが、多孔板20-20-1を通過することができないので、強制的に多孔板20-20-1の表面に付着させられる。通常1めれている液液のみによる細胞の付着時間が4-14日間を要するのに対し、本発明の方法では約30分で付着が完了する。このため、細胞の付着率及び生存率をほぼ100%にできる。

細胞の生産物を、培養液を取り出して多孔板20-20-1に付着した細胞を大に回収させる。この場合は、密閉容器12の液入口22に、0.1-1.0g/lに圧し、新鮮培養液を圧入し、真通孔16を大気圧または0.05atm程度の減圧状態にし、液出入口16を通じて培養液を取り

次に、1-FNの生産、完了した細胞を多孔板20-20-1から剥離して、多孔板20-20-1を再使用する。これは、密閉容器12内の培養液を細胞液と交換した液、真通孔16を通じてトリプシン液を多孔板20-20-1の内面から排出させて、20分間、121でに保つことにより、細胞を培養する。次に、液は排水供給口52から排水を流通させて密閉容器12を37でに保つ。この状態、細胞を多孔板20-20-1の表面に付着させる。表面への付着は、コンプレッサ30及び真空ポンプ32を動かして細胞を細胞培養34から密閉容器12内に満たすと共に、液液10-10に移動し、培養液（1-FN液）また、5相液）を培養液（1-FN液）から密閉容器12内に満たした液、細胞と混合液を流通させ、（P-S液）を、5g/lに圧入して、細胞培養槽34から液入口22を介して密閉容

図 6-6

また、この時ケーシング6を駆動して、孔板20、20を回転すると、3

す。細胞とこれ細胞は、細胞器12を順次で洗浄する。出し、一部は次の培養の細胞として利用するため細胞を槽34に貯留する。

細胞の出し後、多孔板20、20を洗浄する。たりに、密閉容器12をアルカリ液（滅菌性）を含む0.5%の水（化）リウム液で洗。多孔板20、20を10%の約1%に。この操作で、多孔板20、20は、その表面上の付着物を除去することができるので、繰り返し使用できる。

前記実施例では、培養の細胞の供給はとして、培養液を密閉容器2に供給し、培養液を大量に要求する細胞の場合には、次の方法で培養液を供給することができる。まず、培養液の量を密閉容器12の約とし、多孔板20、20の分が流れるようにしてから多孔板20、20を30-50rpmで回さ

る。この状態で流入22から細胞を全量

の細胞の供給効率、大幅に向上する。

また、前記実施例では、細胞の1法として、異なる培養液を流して細胞に代りした培養液を流し、培養液にして安定的な培養液を得てもよい。

更に、前記実施例では、多孔板ケーシング3の回転軸4が一軸の場合、回転した。これに限らず、回転する場合には、第4図に示すように回転軸を軸使用して多孔板ケーシングを回転させてもよい。この場合の細胞の培養装置の全体図を第5図に示す。第5図上で60は密閉容器である。第4図、第5図において前記実施例と同様に、図に示す符号

第4図に示す装置では、ケーシングの多孔板ケーシングの多孔板を回転していないで、図

第4図に示す装置では、ケーシングの多孔板ケーシングの多孔板を回転していないで、図

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明に係る細胞培養装置を示す全体図、第2図は多孔板ケーシングの断面図、第3図は多孔板ケーシングの断面図、第4図は本発明に係る細胞培養装置の他の実施例に使用される多孔板ケーシングの断面図、第5図は第4図の孔板ケーシングに使用された細胞の培養装置

- 1-細胞の培養装置、12-60-密閉容器、14-回転軸、16-貫通孔、22-流入入口、30-圧縮器、32-真空ポンプ、34-細胞貯留槽、36-培養液貯留槽。

発明人 井上士 他

発明の効果

本発明に係る培養方法及びその装置によれば、培養液の多孔板の全体、細胞と培養液を均一に分けて、多孔板に付着した細胞に培養液に含まれている栄養分及び酸素を均一に供給する。従って、大量の細胞を高密度に培

養、細胞の増殖を促進することによって、培養液の初期に培養液の多孔板に細胞を短時間から培養に付着させることができる。

更に、培養終了後に容易に細胞を培養液の多孔板から回収することができるので多孔板の再生が可能である。

培養液の多孔板を孔板の大きな多孔板の支持体の外周上に孔板の小さな多孔板の層を設けた多層構造とすることによって、多孔板の表面のいずれの面からでも均一に培養液の供給及び回収を行うことができ、更に、細胞を容易に付着

2 8

8

54 52 25 12 22

26
26
26

16
1

2

25

2 0 8

1 1
2 5/0
5/08